

PCT/EP 03 / 09892

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



EPO-BERLIN

26-11-2003

REC'D 11 DEC 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 44 072.7

Anmeldetag:

06. September 2002

Anmelder/Inhaber:

Forschungsverbund Berlin e.V., Berlin/DE

Bezeichnung:

System zur Identifikation zellpermeabler
Substanzen, die die Interaktion zwischen
Proteinkinase A-Ankerproteinen und der
Proteinkinase A inhibieren

IPC:

C 07 H, C 07 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



ANWALTSKANZLEI

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider

Patente Marken Design Lizenzen

Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Patentanwälte

European Patent and Trademark Attorneys*

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.*
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.³
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.²
Henry Schneider, Dipl.-Ing.*
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.¹
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.¹
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.*
Dorit Rasch, Dipl.-Chem.*
Dr. Sven Lange, Dipl.-Biologe²
Stephan Mainitz, Dipl.-Chem.

Rechtsanwälte

Jörg K. Grzam
Marco Scheffler

Schützenstraße 15-17
D-10117 Berlin

Tel.: 030/206230 / 030/264 13 30
Fax: 030/264 18 38

office@berlin-patent.net
www.berlin-patent.net

Unser Zeich./our reference
P159902DE-La
Datum/date
Berlin, 06.09.2002

Forschungsverbund Berlin e.V.
Rudower Chaussee 17

12489 Berlin

**System zur Identifikation zellpermeabler Substanzen,
die die Interaktion zwischen Proteinkinase A-
Ankerproteinen und der Proteinkinase A inhibieren**

System zur Identifikation zellpermeabler Substanzen,
die die Interaktion zwischen Proteinkinase A-
Ankerproteinen und der Proteinkinase A inhibieren

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine neue Variante eines Proteinkinase A-Ankerproteins und ein Verfahren zur Identifizierung von Proteinkinase A-Ankerproteininhibitoren.

Bislang wurde der Nachweis, dass es sich bei einem neuen Protein um ein AKAP handelt durch Kopräzipitation erbracht. Dazu wurde ein Antikörper gegen das Kandidatenprotein hergestellt, um es aus Zellen oder Gewebe, in denen es exprimiert wird, immunpräzipitieren. Anschliessend wurde das Vorhandensein von regulatorischen und/oder katalytischen PKA-Untereinheiten im Präzipitat mittels Western Blot untersucht. Die Anwesenheit der PKA-Untereinheiten im Präzipitat spricht dafür, dass das Kandidatenprotein in vivo als AKAP fungiert. Der Nachweis kann auch umgekehrt erbracht werden, indem die PKA-Untereinheiten immunpräzipitiert werden und anschliessend das AKAP im Präzipitat nachgewiesen wird (Diviani et al. J Biol Chem. 276, 44247-57442, 2001). Dieser experimentelle Ansatz erlaubt keinen Rückschluss auf die intrazelluläre Lokalisation des AKAP-PKA-Komplexes. Es existiert derzeit kein System zur Identifizierung von spezifischen AKAP-Inhibitoren.

Es wurde die cDNA einer neuen Spleissvariante des Protein-kinase A-Ankerproteins (AKAP) AKAP18 identifiziert und isoliert (Fig. 1). Diese Variante bezeichnen wir als AKAP18 δ . Die AKAP18 δ -cDNA wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pECFP (BD Biosciences, Clontech) kloniert. Die cDNA der regulatorischen Untereinheit RII α der humanen Proteinkinase A, die uns von Prof. Dr. K. Tasken (Universität Oslo) zur Verfügung gestellt wurde, wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pEYFP (BD Biosciences, Clontech, Heidelberg) kloniert. Eukaryontische HEK293-Zellen (GBF, Braunschweig) wurden mit den Plasmiden kotransfiziert.

Die Interaktion der exprimierten Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP wurde mittels der FluoreszenzResonanzEnergieTransfer (FRET)-Technik in den HEK293-Zellen gemessen (schematische Darstellung in Fig. 3). Die FRET-Technik beruht auf einem Energietransfer von CFP zu YFP, der nur zustande kommt, wenn sich beide Proteine in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (< 10 nm). CFP und YFP erreichen diese Nähe nur, wenn AKAP18 δ die RII α -Untereinheit direkt bindet. In diesem Fall kann ein FRET nachgewiesen werden. Die Spezifität der Interaktion von AKAP18 δ und RII α kann dadurch überprüft werden, dass FRET in Gegenwart des membranpermeablen Peptids S-Ht31, das die Interaktion zwischen dem AKAP und der RII-Untereinheit verhindert, gemessen wird. Eine kontinuierliche Abnahme des FRET-Signals während der Messung bedeutet eine Inhibition der Interaktion zwischen AKAP18 δ und RII α .

Die Sequenz des Peptids S-Ht31 entspricht der der PKA-Bindungsdomäne (RII-Bindungsdomäne) des AKAP Ht31. Es bildet eine amphipathische Helix aus und bindet kompetitiv an die regulatorischen PKA-Untereinheiten. Dadurch verhindert es die Interaktion mit AKAP18 δ . Die Membranpermeabilität erhält das Peptid durch die Kopplung an einen Stearatrest

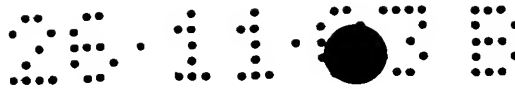


am N-Terminus (Klussmann et al. J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999). Peptide mit der gleichen Aminosäuresequenz (Ht31), die keinen Stearatrest tragen und damit nicht membranpermeabel sind, verändern das FRET-Signal unserem System nicht. Ebenso verändert Stearat-gekoppeltes S-Ht31-Peptid, das durch Einfügen von zwei Prolinen, die die amphipathische Helix stören, das FRET-Signal nicht.

Teil der Charakterisierung eines neu identifizierten AKAP ist der Nachweis, dass es in vivo als AKAP, d.h. als PKA-Interaktionspartner, fungiert. Das oben beschriebene System erlaubt es, die Interaktion von AKAP18 δ und den RII α -Untereinheiten der PKA in lebenden Zellen nachzuweisen. Es ist damit dazu geeignet den Nachweis zu erbringen, dass AKAP18 δ als AKAP in vivo fungiert. Gleichzeitig lässt das System Rückschlüsse auf die intrazelluläre Lokalisation des AKAP18 δ -RII α -Komplexes zu.

Das System wurde anhand der Interaktion von AKAP18 δ und RII α etabliert. Es kann potentiell aber sowohl für andere AKAP als auch für andere regulatorische Untereinheiten (RII β , RII α und β) der PKA genutzt werden.

AKAP sind eine Familie von über 30 Proteinen, deren Funktion bislang nicht durch spezifisch interagierende Substanzen manipuliert werden kann. Das Peptid S-Ht31, mit dem die Bindung von AKAP18 δ und RII α inhibiert wurde (s. o.), ist die einzige bekannte Substanz, die eine AKAP-Funktion beeinflusst. Es inhibiert die AKAP-PKA-Interaktion, allerdings entkoppelt es die Bindung zwischen jeglichem AKAP und allen regulatorischen PKA-Untereinheiten. Mit dem von uns entwickelten System sollen membranpermeable Peptide sowie niedermolekulare, nicht-peptidische Substanzen in gezielten Hochdurchsatzuntersuchungen mittels FRET-Messungen identi-



fiziert werden, die die Interaktion zwischen AKAP185 und RII α spezifisch inhibieren.

Das System kann potentiell aber auch für die Identifikation von Substanzen genutzt werden, die die Interaktion zwischen anderen AKAP und anderen regulatorischen Untereinheiten (RII β , RI α und β) der PKA, inhibieren.

Die Identifizierung spezifischer AKAP-Inhibitoren hat ein grosses therapeutisches Potential. AKAP-PKA-Interaktionen spielen bei verschiedenen exozytotischen Prozessen eine Rolle, deren Fehlregulation zur Entstehung von Krankheiten wie Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Magenulzera oder Schilddrüsenerkrankungen führen. Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu einer PKA-vermittelten Hyperphosphorylierung eines Ionenkanals, des Ryanodinrezeptors (Calciumkanal). Substanzen, die bestimmte AKAP spezifisch inhibieren, könnten als Pharmaka bei diesen Erkrankungen eingesetzt werden.

Das System ist ausserdem geeignet, generell die Membranpermeabilität von Peptiden zu erfassen. Bislange gibt es keine Möglichkeit einen Membrantransfer von Peptiden direkt nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Dies kann nun erreicht werden, indem ein Konjugat aus dem zu untersuchenden Peptid und S-Ht31 bzw. ein Gemisch mit dem Peptid Ht31 hergestellt wird.

Das Neue besteht in der Visualisierung der AKAP-PKA-Interaktion in einer lebenden Zelle und in der Möglichkeit den AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zuzuordnen.

Das System ist jedoch sehr viel breiter verwendbar. Es ermöglicht ein Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation und

quantitativen Analyse von Substanzen, die die AKAP-PKA-Interaktion beeinflussen. Darüberhinaus kann die Membrangängigkeit von Peptiden bestimmt werden.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

Beispiel

Herstellung von Plasmiden, die für die Fusionsproteine AKAP18δ-CFP und RIIα-YFP kodieren

Die kodierende Region der von uns identifizierten AKAP18δ-cDNA (Fig. 1; Sequenz AKAP18δ) wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurden *forward*-Primer (Position in AKAP18δ: bp 57-76) mit der Sequenz 5' CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG GAG CGC CCC GCC GCG GG 3' und *reverse*-Primer (Position in AKAP18δ: bp 1095 - 1118) mit der Sequenz 5' GGC GAC CGG TGG ATC CCG GGC CCG GTT GTT ATC ACT GCC ATC GCC 3', die eine EcoRI- bzw. eine BamHI-Restriktionsschnittstelle tragen, eingesetzt. Als Polymerase wurde der Advantage cDNA polymerase-Mix nach Herstellerangaben eingesetzt. Der benötigte 10x PCR-Puffer wurde mit dem Advantage cDNA polymerase-Mix mitgeliefert. Die Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurden als dNTP-Mix in den PCR-Ansatz pipettiert (Reaktionsansatz siehe unten).

Ein Plasmid, das für die cDNA der humanen RIIα-Untereinheit der Proteinkinase A, wurde mit dem Fachmann bekannter Methode bereit gestellt. Die für RIIα kodierende cDNA wurde mittels PCR aus dem Plasmid amplifiziert. Dazu wurden *forward*-Primer (Position in RIIα: bp 190 - 210) mit der Sequenz 5' TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG AGC CAC ATC CAG ATC CCG 3' und *reverse*-Primer (Position in RI-

I α : bp 1382 - 1401) mit der Sequenz 5' GAC CGG TGG ATC CCG GGC CTG CCC GAG GTT GCC CAG AT 3', die eine XhoI- bzw. eine BamHI-Restriktionsschnittstelle tragen, eingesetzt. Als Polymerase wurde wieder der Advantage cDNA polymerase-Mix. Ebenso wurden der oben beschriebene 10x PCR-Puffer und der dNTP-Mix eingesetzt.

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation von AKAP18 δ und RII α wurden wie folgt angesetzt:

DNA	5 μ l
dNTP-Mix [10 μ M]	1 μ l
Forward-Primer [10 μ M]	1 μ l
Reverse-Primer [10 μ M]	1 μ l
Advantage cDNA polymerase-Mix (5 Einheiten/ μ l)	0,2 μ l
H ₂ O	<u>36,8 μl</u>
Gesamtvolumen	50 μ l

Reaktionsbedingungen:

1 Zyklus	95 °C, 5 min
30 Zyklen	94 °C, 30 sec
	58 °C, 30 sec
	72 °C, 2 min
1 Zyklus	72 °C 10 min
4 °C, ∞	

Das erhaltene AKAP18 δ -cDNA-Amplifikat (Länge: 1061 bp) wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI behandelt, das erhaltene RII α -cDNA-Amplifikat (Länge: 1211 bp) mit den Restriktionsenzyme XhoI und BamHI. Anschliessend wurden die Ansätze in einem Agarosegel aufgetrennt und die AKAP18 δ - bzw. RII α -Amplifikate mittels der GeneClean-Methode aus dem Gel eluiert.

Die AKAP18 δ -cDNA wurde in das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnittene Plasmid, das für das Cyan Fluoreszierende Protein (CFP) kodiert (pECFP, BD Biosciences), einkloniert. Die RII α -cDNA wurde in das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnittene Plasmid, das für das Yellow Fluoreszierende Protein (YFP) kodiert (pEYFP, BD Biosciences), einkloniert. Die erhaltenen Plasmide kodieren somit für die Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP bzw. RII α -YFP. Escherichia coli-Bakterien (Stamm JM109) wurden mit der Plasmid-DNA transformiert. Die in den Bakterien vermehrte Plasmid-DNA wurde mittels der Qiagen-Midi-Plasmidpräparationsmethode entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) isoliert und mittels Transfektion in HEK293-Zellen eingeführt (s.u.).

HEK293-Zellen (GBF, Braunschweig) wurden auf Polylysin-beschichteten 30 mm-Deckgläschen in Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert, bis eine Konfluenz von 40 - 60 % erreicht war. Die Zellen wurden mittels der Lipolectamine-Methode (Gibco Invitrogen, Karlsruhe) mit den AKAP18 δ -CFP- und RII α -YFP-Plasmiden (1 - 2 μ g je DNA) transient transfiziert (Verhältnis von AKAP18 δ -CFP-:RII α -YFP-Plasmid-DNA von 1:4).

Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Messungen

HEK293-Zellen wurden transient mit den für RII α -YFP und AKAP18 δ -CFP kodierenden Plasmiden kotransfiziert. FRET-Messungen wurden 24-48 h nach der Transfektion an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Germany) durchgeführt. Die Daten wurden mittels der Openlab 2.25 Software (Improvision, Coventry GB) gespeichert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 425 für CFP und 488 nm für YFP angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei Wellenlängen von 480/30 für CFP und 535/26 nm für YFP

gemessen. FRET von CFP zu YFP wurde durch Anregung von CFP bei einer Wellenlänge von 425 nm und der Messung der Emission von YFP bei einer Wellenlänge von 535/26 nm bestimmt. Die unspezifische Hintergrundfluoreszenz wurde in einer Region ohne Zellen bestimmt und subtrahiert. Da die Einstellungen am Mikroskop unverändert blieben, konnte in allen Experimenten ein Verhältnis von $535/480 > 0,6$ als positives FRET-Signal bezeichnet werden.

Bei FRET-Experimenten müssen falsch-positive Signale ausgeschlossen werden. Diese sind darauf zurückzuführen, daß bei der Anregung von CFP auch YFP angeregt wird. Des weiteren strahlt die CFP-Emission auch in den Bereich der YFP-Emission hinein. Das Kontrollexperiment zum Nachweis richtig-positiver FRET-Signale erfolgt durch ein Akzeptor-Ausbleichungs-Protokoll (donor recovery after acceptor bleaching). Das Experiment wurde an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Germany) durchgeführt. Hierbei wird bei einer Anregung von 425 nm die Emission bei 480/30 und 535/26 nm mit einer 12 bit CCD-Kamera (Imago, TILL-Photonics, Martinsried, Germany) erfasst. Nach Bestimmung der Basis-Signale erfolgt dann eine starke Anregung von YFP bei einer Wellenlänge von 488 nm, die zum Verlust des YFP-Emissionssignals führt (acceptor bleaching). Die Emission von CFP, die bei einer Wellenlänge von 480/30 nm bestimmt wird, steigt sofort an, da FRET unterbrochen wird (donor recovery). In unserem System musste YFP durch mehrmalige starke Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm ausgebleicht werden, da die Lichtquelle nicht energiereich genug ist. Das Ausbleichen und damit der Verlust des YFP-Emissionssignals geschieht somit stufenweise. Dadurch steigt die Emission von CFP, die bei einer Wellenlänge von 480/30 nm bestimmt wird, kontinuierlich und nicht in einem einzigen Schritt an. Der Anstieg der CFP-Emission wird daher über einen Zeitraum von etwa 120 sec nach Beginn der Akzeptorausbleichung gemessen.

Um die Spezifität des FRET weiter zu untersuchen und zu testen, ob sich die kotransfizierten HEK293-Zellen dazu eignen, membranpermeable Substanzen zu identifizieren, die die Interaktion zwischen RII α -YFP und AKAP18 δ -CFP modulieren, wurden die Zellen mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31 (100 μ M) inkubiert, das generell AKAP-RII-Interaktionen hemmt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem Peptid S-Ht31-P, das keinen Einfluss auf die AKAP-RII-Interaktion hat (Klußmann et al., J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999), inkubiert. FRET-Messungen wurden in Intervallen von 10 min über insgesamt 90 min durchgeführt.

Ergebnis

Zum direkten Nachweis einer Interaktion von AKAP18 δ und den regulatorischen RII α -Untereinheiten der PKA in vivo wurden HEK293 mit Plasmiden kotransfiziert, die für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodieren. Fig. 2 belegt die Koexpression beider Proteine in den gleichen Zellen. Die Expression von RII α -YFP wurde durch Anregung bei 488 nm und Messung der emittierten Fluoreszenz bei 535/26 nm nachgewiesen (Fig. 2A), die von AKAP18 δ -CFP durch Anregung der Fluoreszenz bei 425 nm und Messung der emittierten Fluoreszenz bei 480/30 nm (Fig. 2B). Beide Fusionsproteine zeigten eine diffuse, zytosolische Verteilung. Anschliessend wurden FRET-Messungen an den gleichen Zellen durchgeführt. Dazu wird der Donor CFP bei einer Wellenlänge von 425 nm, angeregt. Hält sich ein geeigneter Akzeptor in seiner unmittelbaren Nähe auf (Abstand < 10 nm), führt die Anregung des Donors zu einem teilweisen Energietransfer auf den Akzeptor YFP, der dann bei einer Wellenlänge von 545 nm fluoresziert (schematische Darstellung in Fig. 3). Demnach wurden zum Nachweis von FRET die HEK293-Zellen (CFP) bei einer Wellenlänge von 425 nm angeregt und es wurde die Emission von YFP bei einer Wellenlänge von 535/26 nm gemessen. Fig. 2C zeigt eine ähnliche Verteilung der dargestellten YFP-Emission wie

in Fig. 2A. Somit hat ein Energietransfer von CFP nach YFP stattgefunden. Fig. 1D zeigt die farbkodierte Darstellung der berechneten Ratio 535/480 von etwa 1.2 - 1.5 der FRET-Signale in diesen Zellen.

Die Spezifität der gemessenen FRET-Signale wurde mittels des Akzeptor-Ausbleichungs-Protokolls überprüft. Fig. 4A beschreibt die Kinetik der von YFP und CFP emittierten Fluoreszenz. Dargestellt ist das Verhältnis von F/F_{\max} in Abhängigkeit von der Zeit (time in sec). F_{\max} entspricht der maximalen Emission von YFP bzw. CFP. Vor der Akzeptorausbleichung beträgt die F/F_{\max} von YFP annähernd 1, die von CFP etwa 0,92. Die Akzeptorausbleichung, beginnend nach 40 sec, führt zu einer starken Abnahme des Emissionssignals von YFP. Die F/F_{\max} für CFP steigt von etwa 0.91 auf etwa 1 an. Aus dem Anstieg der CFP-Emission um etwa 10 % ergibt sich eine FRET-Effizienz von etwa 10 %. Die Regressionsanalyse (Fig. 4B) bestätigt diese Beobachtung. Diese Daten zeigen eine direkte Interaktion von AKAP18 δ und RII α .

Um die Spezifität der Interaktion von AKAP18 δ und RII α und damit des FRET weiter zu untersuchen, aber auch um zu testen, ob sich die kotransfizierten HEK293-Zellen dazu eignen, membranpermeable Substanzen zu identifizieren, die die Interaktion von AKAP18 δ und RII α modulieren, wurden FRET-Messungen in Gegenwart des membranpermeablen Peptids S-Ht31 durchgeführt. Dieses Peptid hemmt generell die Interaktion zwischen AKAP und regulatorischen PKA-Untereinheiten (Klusmann et al., J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999; s. schematische Darstellung Fig. 5A und B). Fig. 6A zeigt das farbkodierte FRET-Signal (Verhältnis 535/480) von AKAP18 δ zu RII α in zwei HEK293-Zellen. Vor der Zugabe von S-Ht31 (Zeitpunkt 0 min) betrug die Ratio 535/480 etwa 1.3. Eine Abnahme des Verhältnisses 535/480 (weniger rot) korreliert direkt mit der Abnahme der Interaktion von CFP und YFP. Die Zugabe von S-Ht31 (100 μ M, nach Zeitpunkt 0) induzierte eine Abnahme des Verhältnisses 535/480 nm um über 50 % inner-

halb von 80 min. Der Mittelwert des Verhältnisses betrug etwa 0.35. Fig. 6B zeigt Zellen, die mit dem wirkungslosen Kontrollpeptid S-Ht31-P inkubiert wurden, das keinen Einfluss auf die AKAP-RII-Interaktion hat. Hier ändert sich das farbkodierte FRET-Signal kaum. Fig. 6C zeigt eine Zusammenfassung der erhaltenen Daten aus Fig. 6A und B. Dargestellt ist die Veränderung des FRET-Signals (in %) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Graphik zeigt die an den Zellen beobachtete Veränderung des FRET-Signals in Gegenwart von S-Ht31 oder S-Ht31-P.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HEK293-Zellen, die AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP koexprimieren, ein geeignetes System zur Identifizierung membranpermeabler Substanzen darstellen, die die Interaktion zwischen diesem AKAP und RII α inhibieren.

Alle bislang bekannten AKAP (inklusive AKAP18 δ) binden regulatorische PKA-Untereinheiten über ein konserviertes Strukturmotiv (amphipathische Helix). Daher kann eine Interaktion jedes AKAP mit einer regulatorischen PKA-Untereinheit in unserem System mittels FRET bestimmt werden. Diese Möglichkeit bedeutet, dass unser System für die Suche nach spezifischen, membranpermeablen Inhibitoren für jede AKAP-PKA-Interaktion nutzbar ist.

Patentansprüche

Isoliertes Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 1,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

- 2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens 40% homolog zu einer der unter a) angegebenen Nucleotidsequenz ist.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass

die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens 60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% homolog zu einer der unter a) angegebenen Nucleotidsequenz ist.
4. Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass

es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.
5. Vektor umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Polypeptid, kodiert durch ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
8. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.

9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass
- es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.
10. Verfahren zur Identifizierung von AKAP-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, dass
- ein erstes Fusionsprotein umfassend ein Peptid kodiert durch ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 und einem ersten Fluoreszenzmarker und ein zweites Fusionsprotein umfassend eine funktionelle Untereinheit einer Proteinkinase A und einen zweiten Fluoreszenzmarker in eine Zielzelle eingebracht werden und die Zielzelle mit einem potenziellen AKAP-Inhibitor in Kontakt gebracht wird und die Detektion der Marker mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer einen Hinweis auf den AKAP-Inhibitor gibt.

25.10.03 B

15.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine neue Variante eines Proteinkinase A-Ankerproteins und ein Verfahren zur Identifizierung von Proteinkinase A-Ankerproteininhibitoren.

Fig. 1A

AKAP18δ**Aminosäuresequenz****M**ERPAAGEIDANKCDHLSRGEETGDLETSPV

GSLADLPFAAVDIQDDCGLPDVPPQGNVPQGNPKRSKENRGDRNDHVKKRK
KAKKDYQPNYFLSIPITNKKITAGIKVLQNSILRQDNRLTKAMVGDGSFH
ITLLVMQLLNEDEVNIGTDALLELKPFVEEILEGKHLTLPFHGIGTFQGQ
VGFVKLADGDHVSALLEIAETAKRTFQEKILAGESRTFKPHLTFMKLSK
APMLWKKGVRKIEPGLYEQFIDHRFGEEILYQIDLCSMLKKKQSNGYHYHC
ESSIVIGEKKORKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETQNKKQPGE
GNSVKAEEGDRNGDGSNNRK

Nukleotidsequenz (SEQ Nr. 1)

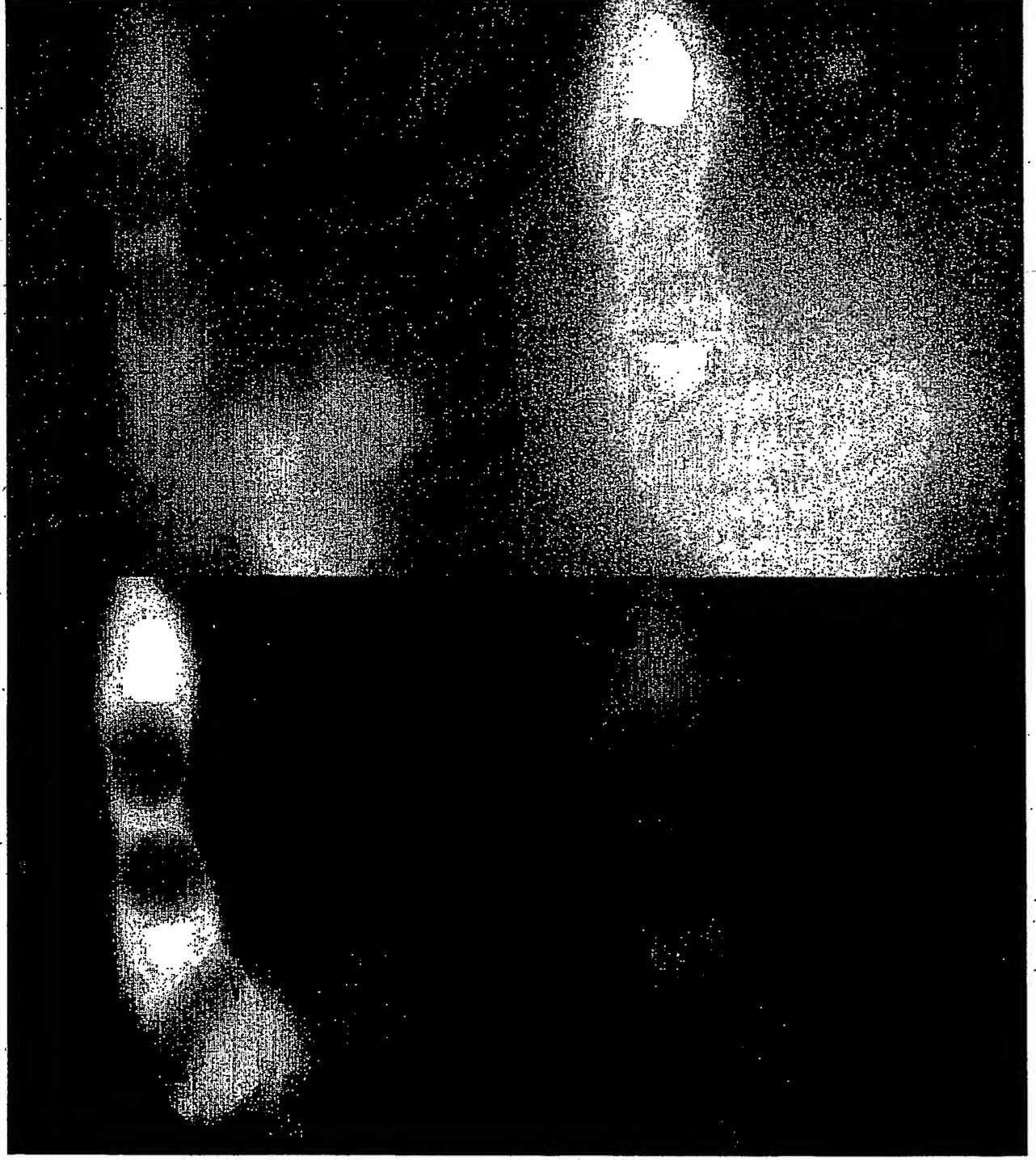
ATGGAGCGCCCCGCCGCGGGAGAAATAGATGCCAATAAGTGTGA
TCATTTATCAAGAGGAGAGGAAGGGACGGGGACCTGGAGACCAGCCCTG
TAGGTTCTCTGGCAGACCTGCCGTTTGCTGCCGTAGACATTCAAGATGAC
TGTGGACTCCCTGATGTACCTCAAGGAAATGTACCTCAAGGAAACCCAAA
GAGAAGCAAAGAAAATAGAGGCGACAGGAATGATCACGTGAAGAAGAGGA
AGAAGGCCAAGAAAGATTATCAACCCAACTATTTCTGTCCATTCCAATC
ACCAACAAAAAGATTACAGCTGGAATTAAAGTCTTGCAAAATTCGATACT
GAGACAGGATAATCGATTGACCAAAGCCATGGTCGGCGACGGCTCCTTTC
ACATCACCTTGCTAGTGATGCAGCTATTAAACGAAGATGAAGTAAACATA
GGTACCGACGCGCTTTTGGAAGCTGAAGCCGTTGTTGAGGAGATCCTTGA
GGGGAAGCATCTGACTTTGCCCTTCCACGGGATTGGCACTTTCCAAGGTC
AGGTTGGCTTTGTGAAGCTGGCAGACGGAGATCACGTCAGTGCCCTCCTG
GAGATAGCAGAGACTGCAAAAAGGACATTTGAGGAAAAAGGCATCCTGGC
TGGAGAAAGCAGAAGCTTTTAAGCCTCACCTGACCTTTATGAAGCTGTCCA
AAGCACCATGCTCTGGAAGAAGGGAGTGAGAAAAATAGAGCCTGGATTG
TATGAGCAATTTATCGACCACAGATTTGGAGAAGAAATACTGTACCAAAT
AGATCTCTGCTCCATGCTGAAGAAAAACAGAGCAATGGTTATTACCACT
GCGAGTCTTCGATCGTGATCGGTGAGAAGGACCGAAAGGAGCCTGAGGAT
GCTGAAGTGGTCAGGCTCAGTAAGAGGCTGGTGGAGAACGCCGTGCTCAA
GGCTGTCCAGCAGTACCTAGAAAGAGACACAGAACAAAAAGCAGCCGGGGG
AGGGGAAGTCCGTCAAAGCTGAGGAGGGAGATCGGAATGGCGATGGCAGT
GATAACAACCGGAAGTGA

Fig. 1B

AKAP18δ	1	MERPAAGEIDANKCDHLSRGEEG	1	GDLETSPVGS	LAD	PFAAVDIQDDCG		
AKAP18γ	1	-----	1	MSEEF	FEANTMD	SLVDMPFATVDIQDDCG		
AKAP18β	1	-----	1	-----	-----	-----		
mAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
hAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
AKAP18δ	51	PDVPQGNV	51	PQGNPKRS	KENRGDRNDHV	KRKKAKKDYQPNYFLSIPITN		
AKAP18γ	29	TTDEP	29	QINLKRSQ	ENEWVKS	DOVKRKKKDYQPNYFLSIPITN		
AKAP18β	1	-----	1	-----	-----	-----		
mAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
hAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
AKAP18δ	101	KKITAGIKVLQNSI	101	TRQDNRLTKAMV	GDGSFHITLLVM	QLLNEDEVNIGT		
AKAP18γ	74	KEIIKGIKILQNAI	74	IQDERLAKAMV	SDGSFHITLLVM	QLLNEDEVNIGI		
AKAP18β	1	-----	1	-----	-----	-----		
mAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
hAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
AKAP18δ	151	DALLELKPFVEEIL	151	EGKHLTLPPH	GIGTFQ	QVGFVKLADGDHVSALLEI		
AKAP18γ	124	DALLELKPFEEEL	124	LOGKHLTLPP	OGIGTF	GNQVGFVKLAEGDHVNSLLEI		
AKAP18β	1	-----	1	-----	-----	-----		
mAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
hAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----		
AKAP18δ	201	AETAKRTFQEK	201	GILAGESRI	FKPHLTFMKLS	KAPMLWKKGV	RKIEPGLYE	
AKAP18γ	174	AETANRTFQEK	174	GILVGESRS	FKPHLTFMKLS	SKSPWLRKNGV	RKIDPDLYE	
AKAP18β	1	-----	1	-----	-----	-----	-----	
mAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----	-----	
hAKAP18α	1	-----	1	-----	-----	-----	-----	
AKAP18δ	251	QFIDHRFGEEILY	251	QIDLCSMLKKK	QSNGYYHCESS	-----	I	
AKAP18γ	224	KFISHRFGEEL	224	YRIDLCSMLKKK	QSNGYYHCESS	-----	I	
AKAP18β	1	-----	1	-----	MGQLCCFPFS	RDEGKISELESS	SSSAVLQRYSKDIPSW	
mAKAP18α	1	-----	1	-----	MGQLCCFPF	AREEGKICE	-----	
hAKAP18α	1	-----	1	-----	MGQLCCFPFS	RDEGKISE	-----	
AKAP18δ	287	VIGEKDRKEPE	287	DAELVRLSKRL	VENAVLKAVQQY	LEETQNK	KOPGEGNSV	
AKAP18γ	260	VIGEKNGGEP	260	DDAELVRLSKRL	VENAVLKAVQQY	LEETQNK	KNKPGE GSSV	
AKAP18β	38	SSGEKNGGEP	38	DDAELVRLSKRL	VENAVLKAVQQY	LEETQNK	KNKPGE GSSV	
mAKAP18α	19	---	19	KDRKEPE	DAELVRLSKRL	VENAVLKAVQQY	LEETQNK	KOPGEGNSV
hAKAP18α	19	---	19	KNGGEP	DDAELVRLSKRL	VENAVLKAVQQY	LEETQNK	KNKPGE GSSV
AKAP18δ	337	KAEFGDRNG	337	GDGSDNNRK	*	-----	-----	
AKAP18γ	310	KTEAADQNG	310	NDNENNRK	*	-----	-----	
AKAP18β	88	KTEAADQNG	88	NDNENNRK	*	-----	-----	
mAKAP18α	65	KAEFGDRNG	65	GDGSDNNRK	*	-----	-----	
hAKAP18α	65	KTEAADQNG	65	NDNENNRK	*	-----	-----	

Fig. 2

Die Interaktion von AKAP188-CFP und RII α -YFP



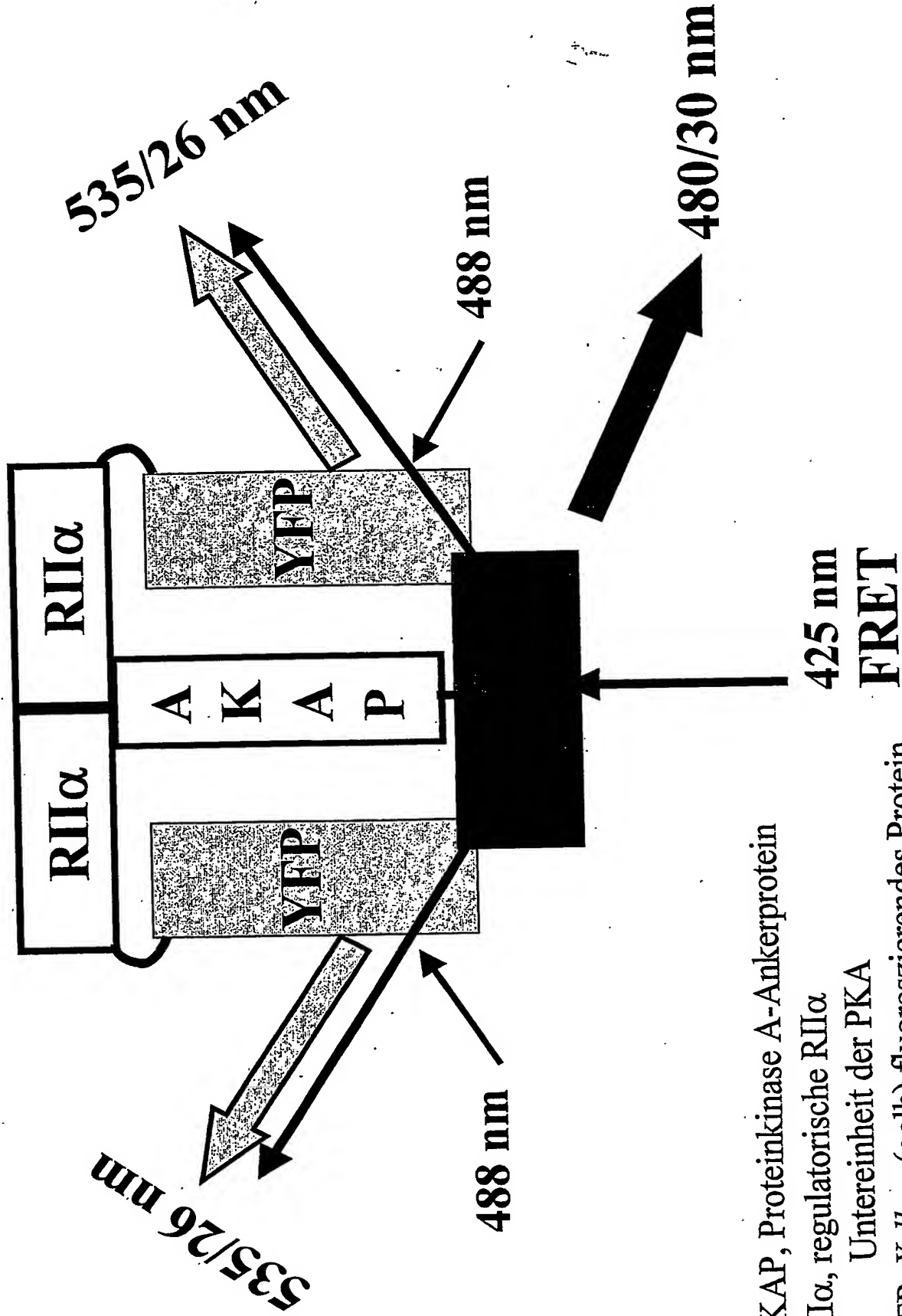
3



0,01

23 100 3

Fig. 3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP



AKAP, Proteinkinase A-Ankerprotein
 RII α , regulatorische RII α
 Untereinheit der PKA
 YFP, Yellow (gelb) fluoreszierendes Protein
 CFP, Cyan (blau) fluoreszierendes Protein

Fig. 4A

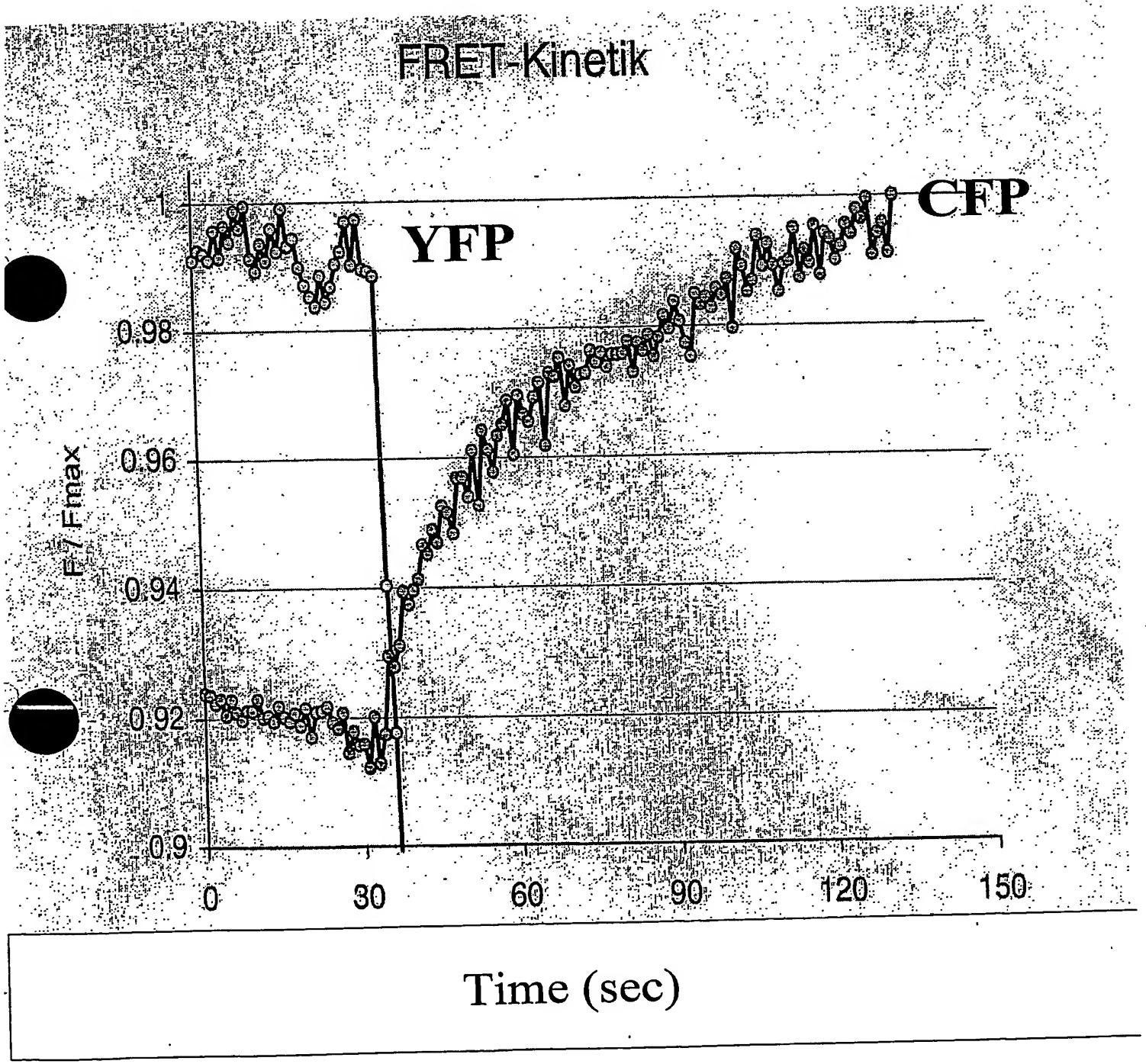


Fig. 4B

Die Ausbleichung des Akzeptors YFP
(RII α -YFP) führt zu einer Zunahme der vom
Donor CFP (AKAP18 δ -CFP) emittierten
Fluoreszenz

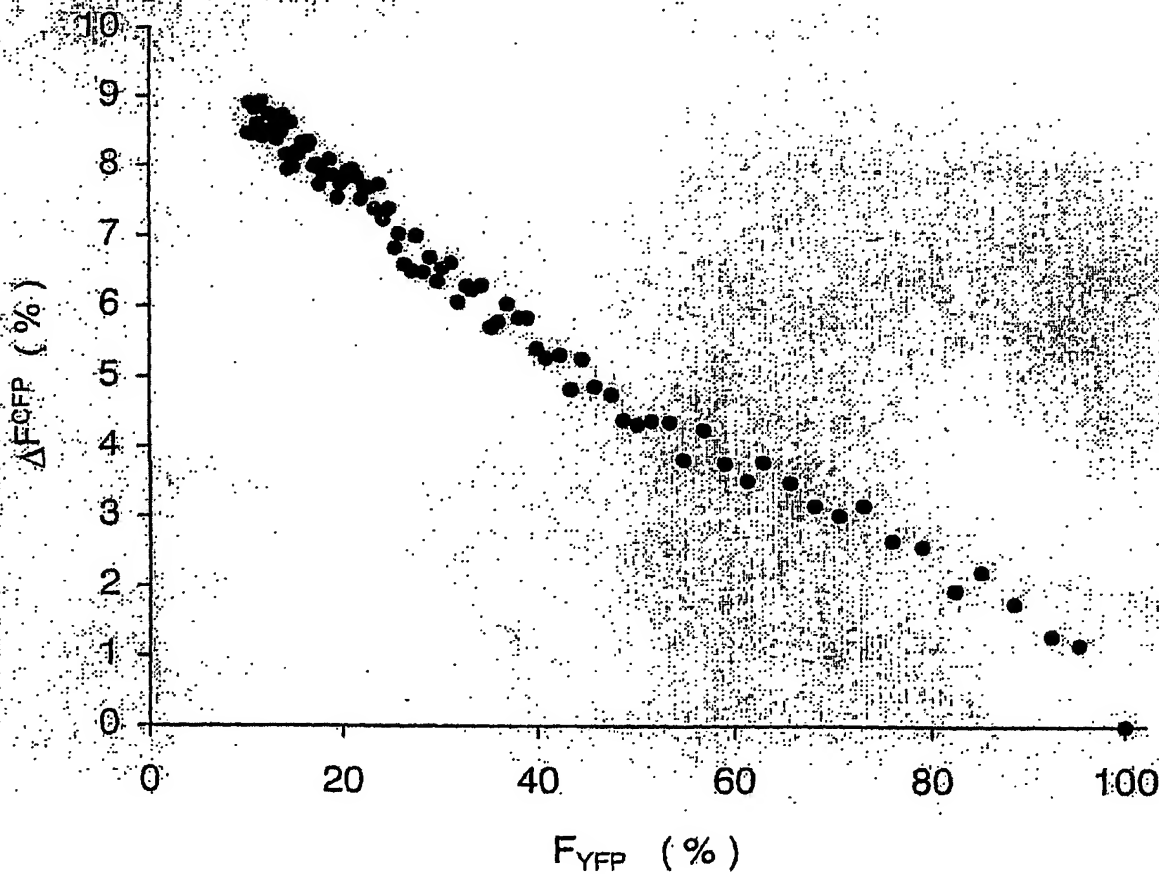


Fig. 5A

Hebung der Interaktion
AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP durch das Peptid S-Ht31

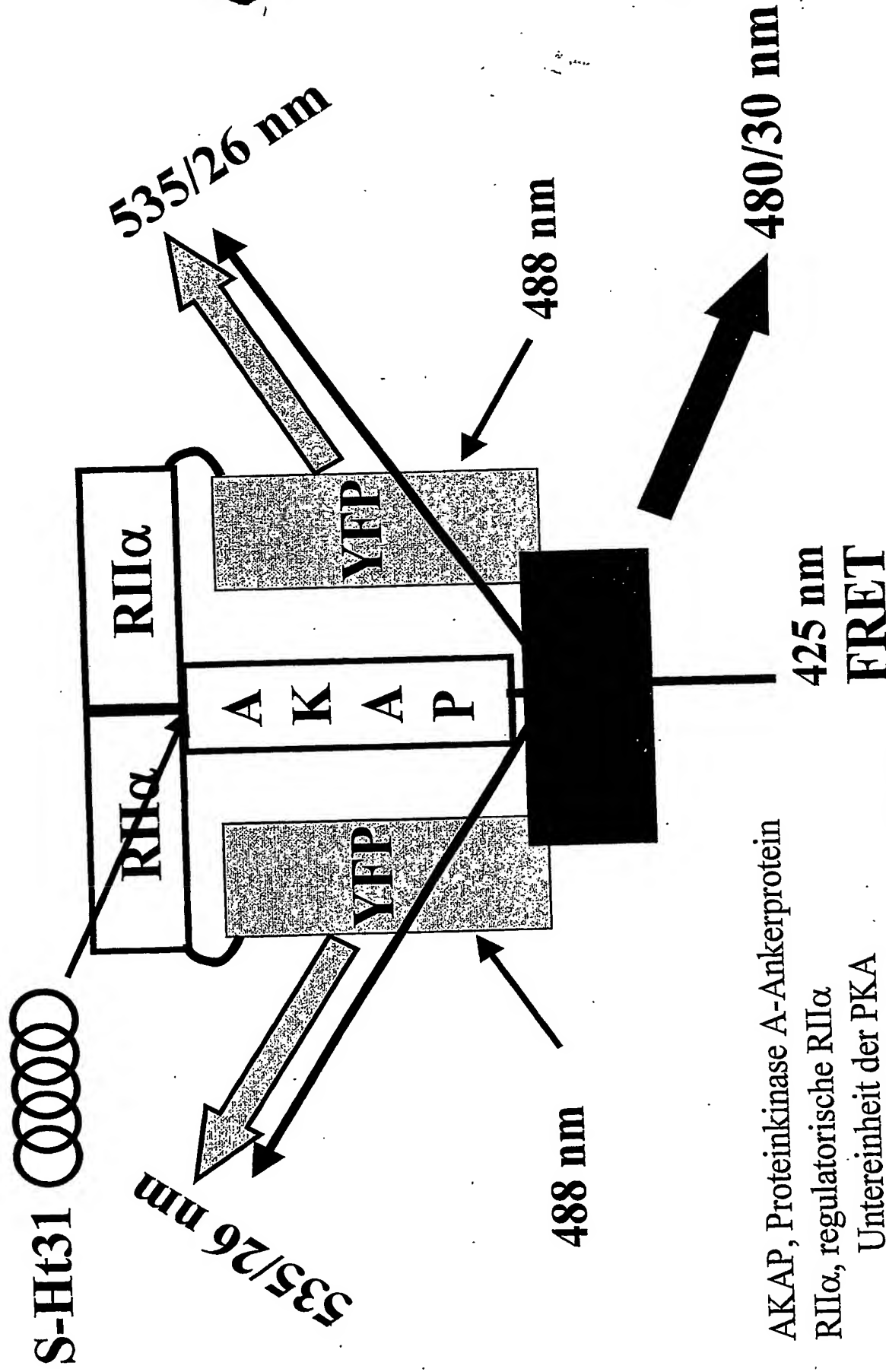
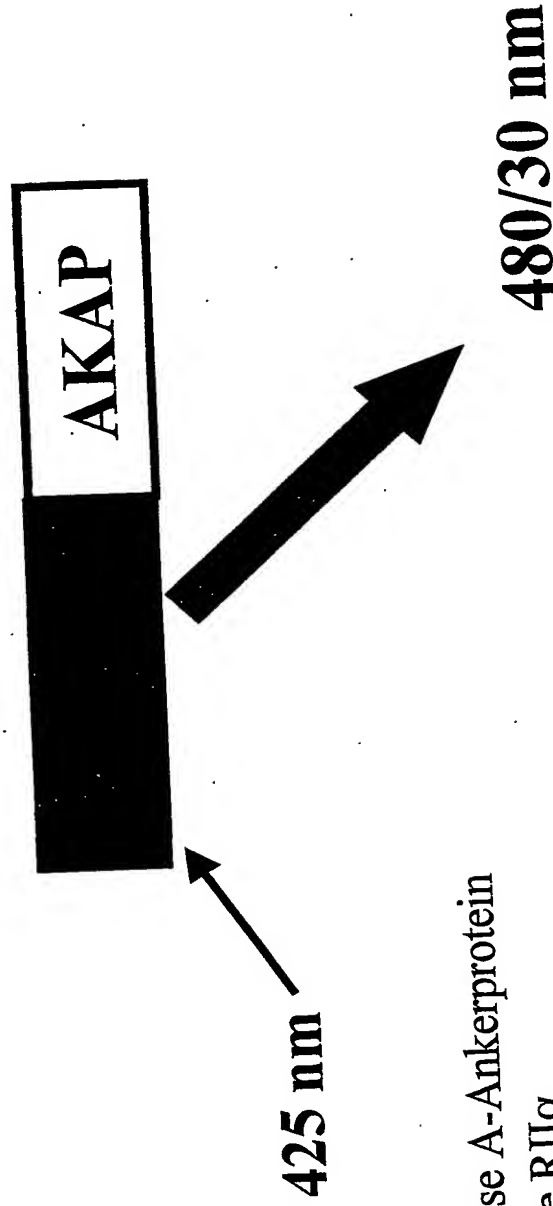
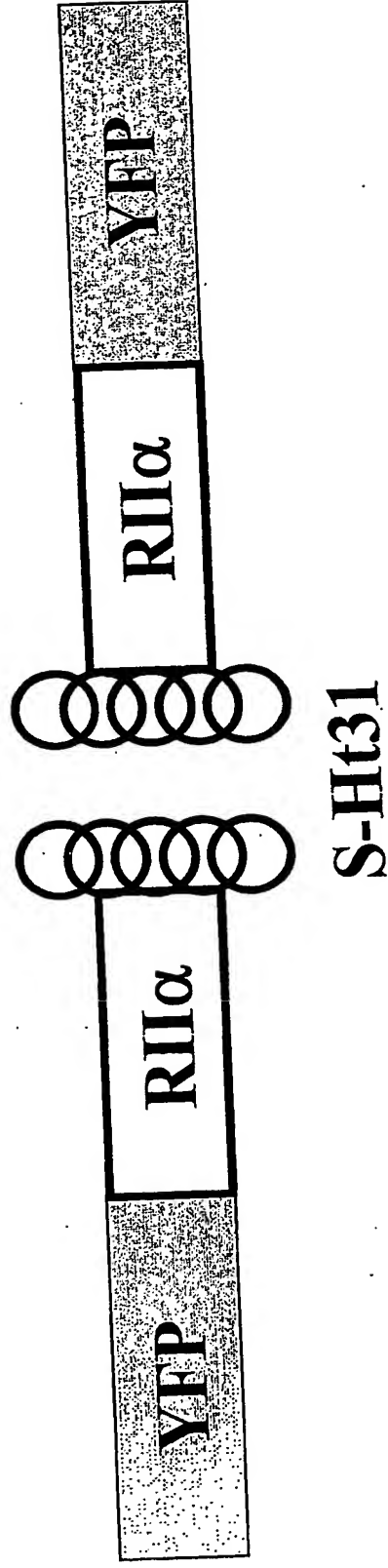


Fig. 5B

Resultat der Hemmung der Interaktion
zwischen AKAP18δ-CFP und RIIα-YFP durch S-Ht31



AKAP, Proteinkinase A-Ankerprotein
 RIIα, regulatorische RIIα
 Untereinheit der PKA
 YFP, *Yellow* (gelb) fluoreszierendes Protein
 CFP, *Cyan* (blau) fluoreszierendes Protein

Fig. 6A Inhibition der Interaktion von AKA-88-CFP und Kluu-YFP durch das Peptid S-Ht31 - Abnahme des FRET-Signals

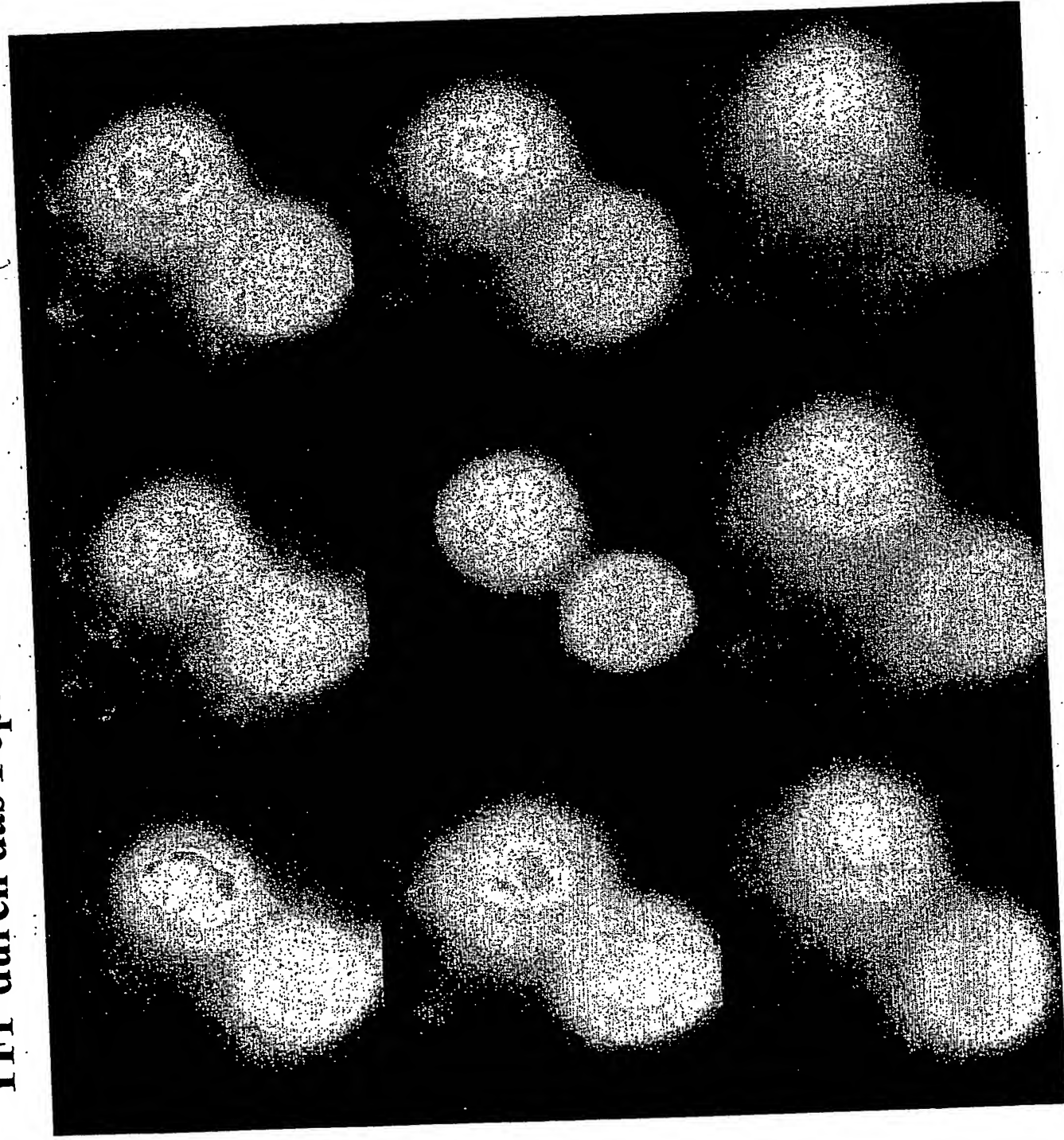
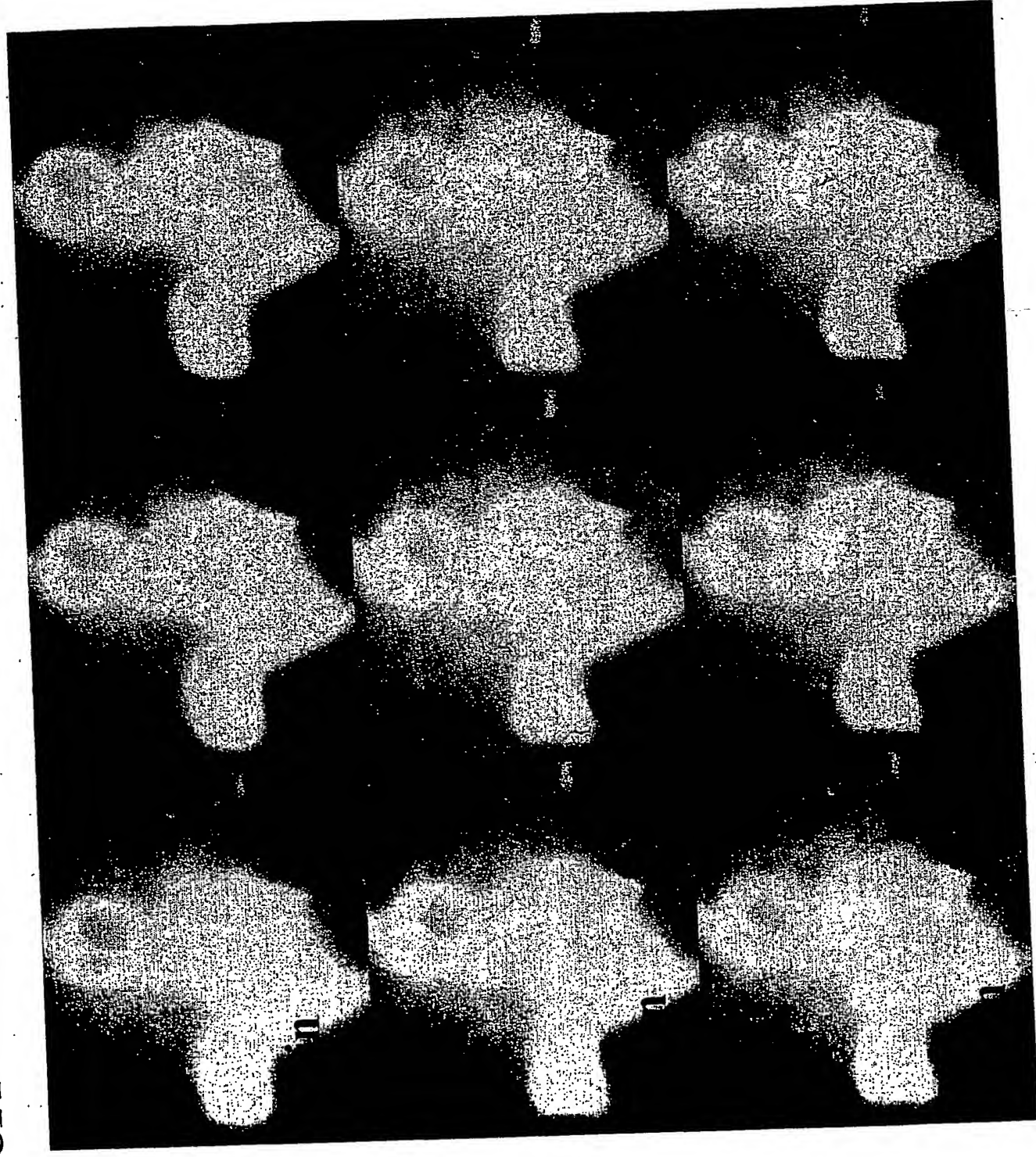


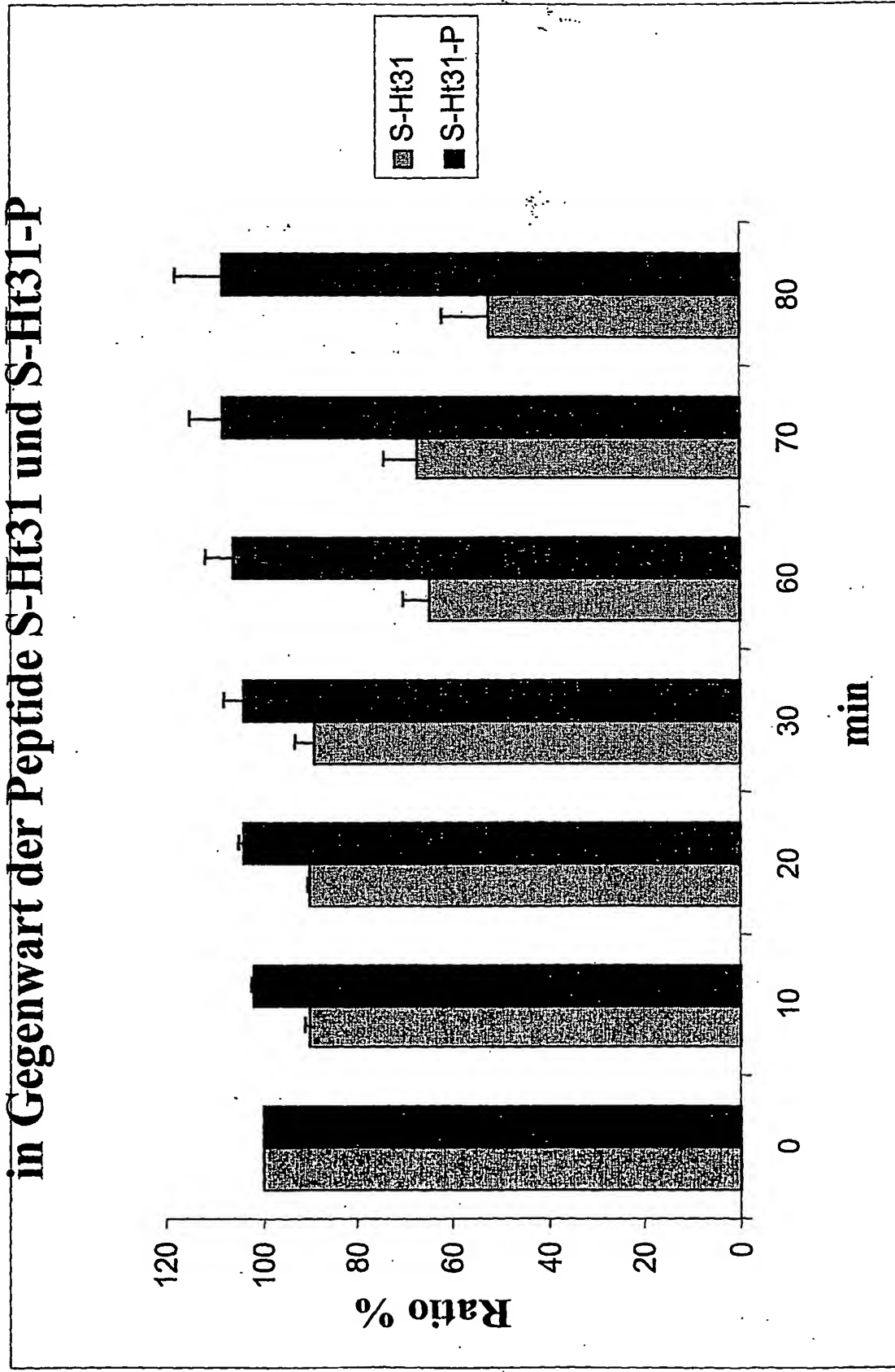
Fig. 6B Das Peptid S-I-1-P hemmt die Interaktion von AKAR180-CFP und RII α -YFP nicht - keine Abnahme des FRET-Signals



28.11.00

Fig. 6C

Veränderungen der FRET-Signale (Ratio 535/480) von
AKAP18 δ -CFP und RI α -YFP in HEK293-Zellen
in Gegenwart der Peptide S-Ht31 und S-Ht31-P



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.